Zur Kenntnis

der

Theobromin- und Coffein-haltigen Glykoside

in den Pflanzen

und

des diese Glykoside spaltenden Fermentes.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt der

Hohen philosophischen Fakultät

der

Kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von

Carl Schweitzer, Apotheker

aus Heilbronn a/N.

München

Druck von Val. Höfling, Kapellenstrasse Nr. 3

1895.

Zur Kenntnis

der

Theobromin- und Coffein-haltigen Glykoside

in den Pflanzen

und

des diese Glykoside spaltenden Fermentes.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt der

Hohen philosophischen Fakultät

der

Kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von

Carl Schweitzer, Apotheker

aus Heilbronn a/N.

München

Druck von Val. Höfling, Kapellenstrasse Nr. 3

1895.

Meinem teuren Vater in Dankbarkeit

gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546008_0153

Die von meinem hochverehrten Lehrer Herrn Hofrat Prof. Hilger gemachte Beobachtung, dass Theobromin und Coffein als Glykoside in den Pflanzen enthalten sind, und die Wichtigkeit der diese Xanthinderivate führenden Pflanzenteile als Nahrungs- und Genuss- beziehungsweise Arzneimittel, welche eine möglichste Klarlegung der näheren Verhältnisse geboten erscheinen lässt, war die Veranlassung zur vorliegenden Arbeit, welche im Anschluss an die Arbeiten von Knebel, „Ueber die Bestandteile der Kolanuss“ und von Lazarus, „Beitrag zur Entstehung der Cacaosamenbestandteile“, im Laboratorium für angewandte Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität zu Erlangen ausgeführt wurde.

Wenn auch die Genussmittel Cacao, Kaffee, Thee u. s. w. bezüglich ihrer Qualität nicht nach ihrem Gehalt an Coffein und Theobromin beurteilt werden, so kommt diesen Stoffen doch eine sehr hervorragende physiologische[1]) Wirkung zu, welche erheischt, dass ihr Vorkommen in vollem Umfange in Betracht gezogen und sowohl das freie Vorhandensein als auch das in gebundenem Zustande berücksichtigt wird. Schon die

1) Schuchardt, Die Kolanuss in ihrer kommerziellen, kulturgeschichtlichen und medizinischen Bedeutung. 1891 und Forts. 1892. Weimar.

abweichenden Angaben über den Gehalt an Coffein und Theobromin in ein und derselben Drogue bei verschiedenen Autoren und die so zahlreichen in Vorschlag gebrachten quantitativen Bestimmungsmethoden, welche zu den verschiedensten Resultaten führen, auch wenn dieselben bei ihrer Gegenprobe mit freiem Coffein und Theobromin sich als zweckmässig und zuverlässig erwiesen haben, lassen erkennen, dass der Ursprung dieser Verschiedenheit wohl auf die Art und Weise des natürlichen Vorkommens zurückzuführen sein wird, und dass die genaue Feststellung dieses Vorkommens Bedürfnis ist.

Es wurde zunächst das Augenmerk auf Untersuchung der frischen Kolanüsse, den im westlichen Centralafrika als Nahrungs- und Arzneimittel verwendeten Samen des Kolabaumes, Cola acuminata (Steruliaceae) und den frischen Früchten verschiedenen Reifezustandes von dem in den Tropenländern sehr verbreiteten und kultivierten Cacaobaum, Theobroma Cacao (Steruliaceae) gerichtet.

Die Kolanüsse des Handels sind durch vorgenommenes Trocknen in Farbe und Geschmack bereits bedeutend verändert und dies tritt bei Cacaosamen noch in grösserem Masse hervor durch die der Ernte folgende Behandlung. Die letzteren werden unmittelbar nach dem Einsammeln dem sogenannten Rotten unterworfen, welches darin besteht, dass die von Schale und Fruchtfleisch befreiten Samen in Haufen geschichtet und mit Erde bedeckt werden, so dass eine Selbstgährung entsteht. Nach 6—8 Tagen wird dann Trocknen der Samen bewirkt, indem sie entweder den direkten Sonnenstrahlen ausgesetzt oder auf Sieben über freiem Feuer bewegt werden. Durch diesen Prozess büssen die Samen ihre Lebensfähigkeit ein und zu gleicher Zeit erfahren sie eine Aenderung in Geschmack und Aussehen, nach

welchen der Cacaofabrikant die Ware beurteilt. Auch die sogenannten ungerotteten Samen, welche ohne Gährung eine möglichst rasche Trocknung erlitten haben, sind bereits verändert, so dass die Wahl von frischen Samen als Untersuchungsmaterial den früheren Versuchen gegenüber für zweckmässig erachtet wurde.

I. Untersuchungen der Kolanüsse.

Bevor ich die von mir angestellten Versuche näher erläutere, muss ich auf die oben erwähnte Arbeit von Knebel, „Ueber die Bestandteile der Kolanuss", zurückkommen und das Ergebnis derselben anführen. Die genannte Arbeit hatte zur Aufgabe, den aus den Kolanüssen nach Entfernung des freien Coffeins und Theobromins durch spirituöse Extraktion gewonnenen Farbstoff „Kolarot" näher zu untersuchen, da dieses sogenannte Kolarot als physiologisch wirksam bekannt war und die Ansicht herrschte, dass in demselben noch Alkaloide enthalten sein werden, deren Isolierung bis dahin noch nicht gelungen war. Das Ausgangsmaterial waren getrocknete Kolanüsse des Handels. Das zu untersuchende Kolarot wurde in der Weise dargestellt, dass gepulverte Kolanüsse mit Alkohol extrahiert, zur Trockne eingedampft und das fein zerriebene Extrakt im Soxhlet'schen Extraktionsapparat mit Chloroform erschöpft wurde. Der so von freiem Coffein befreite Rückstand wurde mit reinem Seesand vermischt und dieses Gemenge in einem Perkolator mit kaltem Wasser extrahiert, bis dasselbe nur noch wenig gefärbt ablief, dann mit Alkohol aufgenommen, filtriert und zur Trockne verdampft. Durch das Ausziehen mit Wasser waren Glykose, Tannin und Salze dem Extrakt entzogen und somit resultierte in dem trocknen rotbraunen Pulver

ein reines Kolarot. Durch die damit angestellten Versuche kam Knebel zu dem Resultate, dass sich beim Behandeln mit Wasser oder Säuren aus demselben Coffein und Glykose abspaltet und dass als drittes Spaltungsprodukt ein stickstofffreies eigentliches Kolarot vorhanden ist. Durch Acetylieren seines ursprünglichen stickstoffhaltigen Kolarots gelang es ihm, allen Stickstoff in Form von Coffein abzuspalten, und eine Acetylverbindung des stickstofffreien Kolarots zu erhalten, deren Reinheit gestattete, Verbrennungen desselben anzustellen, ferner die Anzahl der enthaltenen Acetylgruppen beziehungsweise der vorhandenen Hydroxylgruppen zu ermitteln, sowie nach Abspaltung der Acetylgruppen Verbrennungen des reinen Kolarots anzustellen. Nach seinen Versuchen konnte Knebel dem reinen stickstofffreien Kolarot die Formel $C_{14}H_{13}(OH)_5$ zuschreiben. Beim Schmelzes dieses Kolarots mit Alkalien wurden als Spaltungsprodukte Brenzkatechin, Ameisensäure, Essigsäure und Isobuttersäure erhalten, so dass die nahe Beziehung zur Gruppe der Gerbstoffe bewiesen war.

Fasse ich die Arbeit Knebels zusammen, so wurde dadurch gezeigt, dass das in den getrockneten Kolanüssen enthaltene, durch Chloroform oder Aether ausziehbare Coffein nicht allein der wirksame Bestandteil ist, sondern in dem roten Farbstoff, bis dahin Kolarot genannt, auch ein Glykosid enthalten ist, welches sich in Coffein, Glykose und das eigentliche Kolarot spaltet. Ferner ergab sich daraus die Vermutung, dass auch das freie Coffein mit Glykose und Kolarot ursprünglich in den frischen Früchten zu einem Molekül vereint sein werde, und dass durch Einwirkung eines Ferments eine allmähliche Spaltung eintreten werde. Um diese Vermutungen zu bestätigen, unternahm ich es, im Gegensatz zu den vorhergegangenen

Arbeiten, mit frischen Samen die Versuche fortzusetzen, und es blieb mir dabei hauptsächlich übrig:

festzustellen, ob in den frischen Früchten schon freies Coffein resp. Theobromin vorhanden ist, und dass im bejahendem Falle ein Ferment zu isoliren sein muss, dessen Vermögen, das Glykosid zu spalten, an Versuchen mit dem isolierten Glykosid nachzuweisen wäre, ferner das Glykosid möglichst rein zu isolieren, um damit zu erfahren, in welchem Verhältnis Glykose und Coffein resp. Theobromin mit Kolarot zu einem Glykosidmolekül verbunden sind, endlich nachzuweisen, ob sowohl das freivorkommende, als das im Glykoside gebundene Coffein auch Theobromin enthält und in welchem Verhältnis.

Die mir zur Verfügung gestandenen Kolanüsse schwankten im Gewicht zwischen 10 und 20 Gramm und waren gelblichweiss bis schön hellrosa gefärbt, welche Farbe beim Zerstampfen und bei der spirituösen Extraktion immer mehr in braunrot überging. Sie waren mir von Apotheker Dietz in Mühlhausen (Elsass), einem Fabrikanten von Kolapräparaten, aus einer damals direkt bezogenen Sendung überlassen, und ebenso habe ich von demselben ein Pulver von getrockneten Kolanüssen bezogen, welches mir dazu diente, um mit dem daraus gewonnenen Glykosode gleichzeitig und vergleichsweise mit dem Glykoside aus frischen Nüssen quantitative Spaltungen vorzunehmen.

Da aus einer zerkleinerten Probe der frischen Nüsse mittelst Chloroform freies Coffein resp. Theobromin zu erhalten war, wurden 300 Gramm feinst zerquetschten Materials mit Chloroform am Rückflusskühler mehrmals ausgekocht und der Chloroformauszug abgedampft. Um von dem durch Chloroform mit in Lösung

gegangenen Fett möglichst zu befreien, wurde in warmem Wasser aufgenommen, filtriert, eingedampft, nochmals in Wasser aufgenommen und, um auch von dem Farbstoff zu befreien, mit Sand eingedampft und im Soxhlet'schen Extraktionsapparat mittelst Chloroform ausgezogen. Der Rückstand dieses Auszugs betrug 1,851 g, welche Menge einem Gehalt von 0,613 % an freiem Coffein resp. Theobromin entspricht. Diese Zahl ist natürlich eine relative, da je nach vorgeschrittener Zersetzung des Glykosides der Prozentsatz an freiem Coffein wechselt. Immerhin tritt die gefundene Menge gegenüber dem Gehalt der Handelswaare zurück und beweist die Annahme, dass allmählich beim Ausreifen der Früchte und namentlich noch beim künstlichen Trocknen derselben sich eine Spaltung des Glykosides vollzieht. Unterstützt wird diese Ansicht auch noch durch die Thatsache, dass das Glykosid sich schon beim Liegen an der Luft und beim Kochen mit Wasser teilweise spaltet.

Zur qualitativen Trennung von Coffein und Theobromin machte ich Gebrauch von dem verschiedenen Verhalten beim Sublimieren der beiden Körper, welches zuerst von Eminger zur Anwendung kam. Ich benützte hiezu ca. 10 cm lange, unten zugeschmolzene enge Glasröhrchen, in welche geringe Proben des Gemisches gegeben wurden und sublimierte aus dem Paraffinbade. Bei ca. 190° begann die Sublimation von Coffein, welche fortgesetzt wurde, solange unterhalb 215° noch etwas sublimierte. Dies kann man leicht dadurch konstatieren, dass man das Röhrchen um ca. $^1/_2$ cm aus dem Oelbade heraushebt und beobachtet, ob sich an der freien Stelle Nadeln bilden; ist dies der Fall, so taucht man wieder ein, um nach einiger Zeit den Versuch zu wiederholen. Nachdem nun bei dieser Temperatur die Sublimation beendet war, wurde die Tem-

peratur gesteigert und bei 220° begann dann auch eine neue Sublimation, welche die Anwesenheit von Theobromin verriet. Dieser qualitative Nachweis ist etwas langwierig, führt jedoch bei Verwendung von ganz geringen Mengen zu einem befriedigenden Resultat.

Zur quantitativen Trennung erschien die sogenannte Brunner'sche Methode, die Abscheidung des Theobromins als Silbersalz nach der von Kunze[1]) vorgeschlagenen Abänderung, welche eine Titration gestattet, die zweckmässigste.

Verwandt wurde eine $^1/_{10}$-Normalsilberlösung, welche 0,17 Ag NO_3 = 0,108 Ag in 10 ccm enthielt und eine frisch eingestellte Rhodanammoniumlösung von der 49,4 ccm = 10 ccm der Silberlösung = 0,108 Ag entsprachen. Die Ausführung geschah auf folgende Weise:

Die genau gewogene Menge der Mischung wurde in ammoniakalischem Wasser gelöst, auf dem Wasserbade zum Kochen erhitzt, 5 ccm obiger Silbernitratlösung zugegeben und bis auf wenige Kubikcentimeter abgedampft, indem vor Staub und Licht möglichst geschützt wurde. Die Lösung wurde von der Ausscheidung abfiltriert und letztere mit kochendem Wasser so lange gewaschen, bis das ablaufende Wasser keine Silberreaktion mehr zeigte. Nachdem Filtrat und Waschwasser erkaltet, wurde nach Zusatz von ca. 5 ccm kalt gesättigter Ferriammoniumsulfatlösung als Indikator und ausgekochter Salpetersäure bis zur Entfärbung das überschüssige Silbernitrat zurücktitriert. Beim Arbeiten mit der verdünnten Rhodanammoniumlösung empfiehlt es sich, zuvor einige Titrationsproben zu machen, um den Farbenumschlag scharf beobachten zu können.

Das Ergebnis von zwei Versuchen, welche auf diese Weise ausgeführt wurden, ist folgendes:

1) Zeitschrift für analyt. Chemie XXXIII, I pg. 24 ff.

	Minderverbrauch von Rhodanammonlösung	Entspr. Menge Ag	Entspr. Menge Theobr. Ag × 1,66	Angewandte Substanz	% Gehalt an Theobromin
I. V.	1,05 ccm	0,002298	0,0038 g	0,3161 g	1,21 %
II. V.	0,65 ccm	0,00141	0,00234 g	0,1951 g	1,19 %

Somit bestehen die in den untersuchten Kolanüssen frei vorhandenen Xanthinderivate aus 98,8 % Coffein und 1,2 % Theobromin.

Darstellung des Ferments.

Um etwa vorhandenes Ferment zu isolieren, wurden die zerstampften Nüsse mit 20 proc. Alkohol einige Zeit digeriert und nach dem Kolieren in absoluten Alkohol einfiltriert. Nach dem Absitzen des flockigen, gelblichen Niederschlages wurde die überstehende Flüssigkeit grösstenteils abgehoben und der Rest mittelst der Saugpumpe durch gereinigten Astbest in einer nach dem Allihn'schen Prinzip ausgezogenen Röhre filtriert, in welcher dann auch unter Vermeidung des Trockenwerdens eine sofortige Auflösung mit Wasser wieder vorgenommen werden konnte. Die wässrige Lösung wurde nochmals mit absolutem Alkohol gefällt, der Niederschlag in der gleichen Weise gesammelt, mit absolutem Alkohol gewaschen und, nachdem mit einer Probe davon durch Erhitzen mit einem Stückchen Natrium sich die Abwesenheit von Ammoniak bezw. Stickstoff ergeben hatte, sofort in wenig Wasser gelöst. Nachdem durch einen Versuch mit frisch bereiteter Fehling'scher Lösung bewiesen war, dass reduzierende Substanzen — Zucker — in der Fermentlösung nicht vorhanden waren, wurde ein Teil zur Verzuckerung

einer sehr verdünnten Stärkelösung bei einer Temperatur, welche 55° nicht überschritt, verwendet. Schon nach $^1/_2$—1 Stunde war eine Zuckermenge gebildet, die eine deutliche Reduktion der Fehling'schen Lösung hervorrief, und es war damit die diastatische Wirkung des isolierten Körpers bewiesen. Der andere Teil wurde zur Spaltung des auf die nachfolgend beschriebene Weise gewonnenen Glykosides benützt.

Darstellung des Glykosides (Kolanin).

Die Samenrückstände nach Ausziehen des Ferments wurden mit 90% Alkohol am Rückflusskühler wiederholt ausgekocht, nach dem Filtrieren der Spiritus verjagt und der Rückstand gemeinschaftlich mit dem Verdampfungsrückstand der oben erhaltenen alkoholischen Lösungen, aus welchen das Ferment ausgefallen war, auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Hierauf wurden mit Wasser Salze, freies Coffein und Theobromin sowie Zucker u. s. w. aufgenommen. Der noch verbliebene Rückstand wurde dann in viel kaltem alkalihaltigem Wasser gelöst, filtriert und durch Abstumpfen des Alkalis mittelst Salzsäure eine Ausscheidung verursacht. Von der flockigen Abscheidung wurde nach dem Absitzen dekantiert, der Niederschlag in alkalihaltigem Wasser gelöst, durch Salzsäure Abscheidung bewirkt und dies noch einigemale wiederholt, um ein möglichst aschefreies Glykosid zu erhalten. Zuletzt wurde auf dem Filter abgesaugt, ausgewaschen und auf Tontellern möglichst rasch getrocknet. Die Farbe des amorphen Rückstandes war nach dem Trocknen eine rotbraune.

Auf die eben geschilderte Weise wurde auch aus den getrockneten Kolanüssen ein Glykosid dargestellt, welches sich im Aussehen nicht von dem anderen unterschied.

Die alkalische Lösung von Proben der gewonnenen Substanzen brachte in Fehling'scher Lösung keine Reduktion hervor, dagegen trat eine solche ein, nachdem zuvor mit ca. 5proc. Schwefelsäure einige Zeit gekocht war, wodurch die Abspaltung von Glykose aus dem Körper bewiesen wurde. Eine andere Probe wurde nach dem Kochen mit 5proc. Schwefelsäure und Erkalten mit Chloroform ausgeschüttelt und mit dem Verdampfungsrückstand des Chloroformauszugs die Amalinsäurereaktion angestellt, welche die Abspaltung von Coffein bezw. Theobromin ergab.

Ferner wurden Spaltungen mittelst der oben erhaltenen Fermentlösung vorgenommen, indem auf dem Wasserbade bei ca. 50° einige Stunden lang erwärmt wurde. Nach dieser Zeit konnte die Abspaltung von Zucker mittelst Fehling'scher Lösung deutlich nachgewiesen werden.

Durch diese Versuche wurde einerseits bewiesen, dass das isolierte Ferment imstande ist, das Glykosid zu spalten, andererseits, dass der als vermutliches Glykosid isolierte Körper thatsächlich ein Glykosid ist, welches bei der Zersetzung Coffein bezw. Theobromin und Zucker abspaltet.

Trotz der oben beschriebenen vielfachen Reinigungsversuche durch Lösen und Wiederausfällen war es nicht möglich, ein vollständig aschefreies Glykosid zu erhalten; das Glykosid aus den frischen Früchten enthielt 1,15 %, das aus den trocknen 1,06 % Asche.

Versuche über die Spaltung des Glykosides.

Behufs Ermittelung der Spaltungsprodukte des Glykosides wurden abgewogene Mengen der Glykoside — es wurden immer gleichzeitig Parallelversuche mit dem Gly-

koside aus den frischen und dem aus den getrockneten Samen angestellt — mit der ca. 20fachen Menge 5proc. Schwefelsäure am Rückflusskühler während 4—6 Stunden bei einer Temperatur, welche die verdünnte Schwefelsäure eben im Kochen erhielt (Oelbad ca. 130—140°), im Oelbad erhitzt, hierauf von dem ungelösten Kolarot abfiltriert und auf ein bestimmtes Volumen mit Wasser ergänzt. Die Hälfte davon wurde mit Kalilauge übersättigt und in zwei Proben zur quantitativen Glykosebestimmung mittelst Fehling'scher Lösung verwendet. Die zweite Hälfte wurde mittelst frisch gefällten Baryumkarbonats möglichst genau neutralisiert und unter Zugabe von etwas Sand zur Trockne verdampft; der Rückstand wurde im Soxhlet'schen Extraktionsapparat mittelst Chloroform ausgezogen, der Verdampfungsrückstand des Chloroformauszugs in Wasser aufgenommen, um vom anhaftenden Fett möglichst zu befreien, die filtrierte wässrige Lösung in gewogener Platinschale zur Trockne verdampft und so die Gewichtsmenge des Rückstandes bestimmt.

Die Trennung des Rückstandes wurde wiederum nach der früher beschriebenen Methode mittelst Bildung von Theobrominsilber vorgenommen und zwar wurde diesmal eine $^1/_{100}$-Normalsilberlösung = 0,0108 Ag in 10 ccm und eine Rhodanammoniumlösung von der 26,7 ccm = 10 ccm der Silberlösung, verwendet. Es ergab sich ein Gehalt von 19,7 % Theobromin. Es wurde die Gegenprobe gemacht, indem die Lösung, welche das Coffein enthielt, genau neutralisiert und mit Sand zur Trockne gebracht wurde. Aus dem Rückstande wurde das Coffein mittelst Chloroform ausgezogen, das Chloroform verdampft und in der Platinschale gewogen. Die erhaltene Menge entsprach 79,4 % Coffein. Die fehlenden 0,9 % sind jedenfalls auf die Verunreinigung mit anhaftendem Fett zurückzuführen, welches in Spuren

selbst bei Anwendung von Wasser als Lösungsmittel mit in Lösung geht.

Um die gefundene Menge des Gesamtrückstandes von Coffein und Theobromin mit der gefundenen Menge Glykose bezüglich ihres Molekularverhältnisses vergleichen zu können, musste also die Menge Coffein und Theobromin durch Multiplikation mit $\frac{(194.4)+(180.1)}{5} = 191$ modifiziert werden, während die Glykosemenge mit 180 zu multiplizieren war.

Das Ergebnis der quantitativen Spaltungen war:

Glykosid aus	Glykose	Coffein und Theobromin	Multipliziert mit Molekul.-Gewicht Glyk. : Coff. Theobr.	Also Verhältnis von Glyk. : Coff. Theobr.
frischen Samen	1,05%	0,316%	189 : 60,356	3,1 : 1
getrockneten Samen	0,98%	0,294%	176,4 : 56,154	3,14 : 1

Diese angeführten Zahlen sind das Mittel von mehreren Versuchen, die ziemlich übereinstimmendes Resultat lieferten, mehrmals jedoch erst nachdem eine zweite Hydrolyse mit einer weiteren Menge 5proc. Schwefelsäure vorgenommen und das Ergebnis derselben zu dem Resultat der ersten Spaltung addiert wurde. Ob die Spaltung mit 5% Schwefelsäure eine vollkommene ist, kann nicht mit Sicherheit behauptet werden, immerhin wurde dadurch ein Maximum erreicht, so dass ein weiterer Versuch mit gleich starker Schwefelsäure zu keinem Resultate führte. Kochen mit einer stärkeren Säure ergab kein Ergebnis, da zu gleicher Zeit Veränderung der Xanthinderivate wie auch teilweise des Zuckers eintrat. Dagegen ist das Verhältnis von Zucker und Coffein bezw. Theobromin auch bei nur teilweiser

Spaltung ein konstantes, und zwar sowohl bei den Versuchen mit dem Glykoside aus den frischen Nüssen wie auch bei dem aus der Handelsware kommen auf 3 Moleküle Glykose 1 Molekül (Coffein, Theobromin).

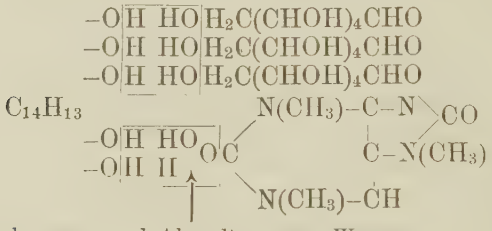
Vergleicht man den Gehalt von 1,2 % Theobromin des in den frischen Nüssen frei vorhandenen Coffeins mit dem Gehalt von 19,7 % Theobromin des aus dem Glykoside erhaltenen Coffeins und zieht in Erwägung, dass der Gehalt von 1,2 % ungefähr mit der bei früheren Gesamtbestimmungen der Xanthinderivate in den Kolanüssen angegebenen Menge [1]) übereinstimmt, so muss man wohl annehmen, dass in dem Glykosidmolekül vielleicht ursprünglich nur Coffein enthalten ist, bei der durch das vorhandene Ferment nach und nach eintretenden Spaltung sich jedoch ein geringer Teil Theobromin bildet und dass bei der stärkeren Einwirkung der Säure unter den sonst gleichen natürlichen Verhältnissen die Abspaltung der Methylgruppe im Coffein, welche zum Theobromin führt, noch erleichtert wird.

Das Verhältnis gewichts-analytisch festzustellen, in welchem sich der stickstofffreie Gerbstoff „Kolarot“ an der Bildung des Glykosidmoleküls beteiligt, war durch diese Versuche nicht möglich, da sowohl das Glykosid, wie das stickstofffreie Kolarot sich in Alkohol und alkalihaltigem Wasser lösen und daraus durch Säure abgeschieden werden und somit der als Glykosid gewonnene Körper noch stickstofffreies Kolarot enthält, welches schon in den verhältnismässig jungen Samen und namentlich auch während und nach der Isolierung entsteht. Da jedoch die von Knebel für das Kolarot aufgeaufgestellte Formel $C_{14}H_{13}(OH)_5$ fünf Hydroxylgruppen enthält uud sich Glykose und Coffein im Verhältnis 3 : 1

1) Heckel et Schlagdenhauffen, Des Kolas africains au point de vue botanique, chimique et thérapeutique. Journal de Chimie et Pharmacie, Paris 1883.

abspalten, so erscheint es wahrscheinlich, dass ein Molekül Kolarot in dem Glykosid enthalten ist.

Wenn auch die erwähnte leichte Zersetzlichkeit des isolierten Glykosides und die Kompliziertheit der Zusammensetzung dieses hochmolekularen Körpers es sehr gewagt erscheinen lassen eine Gesamtformel aufzustellen, so wäre immerhin anzunehmen, dass unter Benützung jener Formel für das stickstofffreie Kolarot folgende einfachste Zusammensetzung möglich wäre:



Anlagerung und Abspaltung von Wasser

welches eine ätherartige Verbindung von 1 Molekül Kolarot, 3 Molekülen Glykose und 1 Molekül Coffein vorstellen und die Gesamtformel $C_{40}H_{56}N_4O_{21}$ erhalten würde. Nach dieser Formel würde das Glykosid bei der Hydrolyse 4 Wassermoleküle aufnehmen, um in seine Bestandteile zu zerfallen. Die Formel würde nicht ausschliessen, dass die Glykosemoleküle noch durch Anhydridbildung ätherartig unter einander verbunden sind.

II. Untersuchung der Cacaofrüchte.

Die bereits erwähnte Arbeit über das Glykosid der Cacaosamen von Lazarus möge hier in ihren wesentlichen Punkten angeführt werden.

Da sich erwiesen hatte, dass das Kolarot ein coffein- und theobrominhaltiges Glykosid enthalte, so war die Vermutung berechtigt, dass auch der Gerbstoff der

Cacaosamen, das Cacaorot, aus einem ähnlichen Glykosid bestehe. Zur Anstellung der bezüglichen Versuche wurden geröstete Cacaosamen verwendet, indem zuerst mittelst Petroläther das Fett und ein Teil des freien Theobromins, mittelst Wasser das übrige Theobromin und Coffein, der Zucker und die Salze gelöst und dann mittelst Alkohol der bisher mit dem Namen Cacaorot belegte Farbstoff ausgezogen. Der Verdampfungsrückstand des alkoholischen Auszugs wurde möglichst schnell auf Tontellern getrocknet. Das gewonnene Material war ein rotbraunes, amorphes, bitterlich schmeckendes Pulver, das in Wasser kaum löslich war, leicht dagegen in Alkohol und verdünntem Alkali, aus welch' letzterer Lösung es durch verdünnte Säuren wieder ausgefällt wurde. Durch Sublimation dieses gewonnenen Körpers, bei welcher sich das obere Uhrglas mit einer Menge feiner Nadeln, die sich durch die Amalinsäurereaktion als Theobromin eventuell Coffein zu erkennen gaben, und auch durch Kochen desselben mit 5 % Schwefelsäure, bei welchem die Abspaltung von Zucker, Coffein und Theobromin sowie dem eigentlichen Farbstoff, dem stickstofffreien Cacaorot, nachgewiesen wurde, kam Lazarus zu dem Schlusse, dass der bisher als Cacaorot bezeichnete Körper als ein Glykosid zu betrachten ist. Durch Verbrennung dieses Glykosids stellte er für dasselbe die Werte $C_{34}H_{48}O_{18}N_2$ auf. Ueber die Spaltung des Glykosids in seine Bestandteile sagt Lazarus: „Es ist mit grosser Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass dieselbe in molekularen Gewichtsverhältnissen stattfindet; genau liess sich dies im gegebenen Falle nicht feststellen, da das eine Spaltungsprodukt kein einheitlicher Körper, sondern ein Gemenge von Theobromin und Coffein war. Für eine Spaltung in molekularen Gewichtsverhältnissen spricht aber entschieden die Thatsache, dass die Abspaltung des Zuckers aus verschiedenen

Gewichtsmengen derselben prozentischen Zusammensetzung entsprach".

Die sich abspaltende Zuckerart charakterisierte sich durch ihr Osazon als Glykose.

Es wurde Acetylierung des Glykosides vorgenommen, da eine Acetylierung des stickstofffreien Cacaorots nicht gelang. Bei der Acetylierung hat sich der Stickstoff abgespalten und als Theobromin in der wässrigen Lösung gefunden. Das gewonnene Derivat wurde nach seiner Reinigung teils zur Bestimmung der eingetretenen Acetylgruppen, teils zur Darstellung des reinen Cacaorots benützt. Das letztere wurde erhalten durch Abspaltung der Acetylgruppen mittelst Kalilauge durch Erwärmung und darauffolgenden Zusatz von überschüssiger Salzsäure als rotbraune Fällung, die nach dem Auswaschen und Trocknen über Schwefelsäure zu Verbrennungen diente. Die Bestimmung der Acetylgruppen geschah durch Verseifen des Acetylderivats mit Kalilauge, Uebersättigen mit Phosphorsäure, Ueberdestillieren der Essigsäure und Auffangen derselben in einer bestimmten Menge Kalilauge, deren Ueberschuss zurücktitriert wurde. Auf diese Weise wurde die Anwesenheit von 10 Acetylgruppen ermittelt, welche 10 Hydroxylgruppen der nicht acetylierten Verbindung entsprechen, und mit Rücksicht darauf, sowie aus dem Ergebnis der Verbrennungen konnte dem Cacaorot die Formel $C_{17}H_{12}(OH)_{10}$ erteilt werden. Bei der Einwirkung von ätzenden Alkalien auf das Cacaorot wurde Ameisensäure, Essigsäure und Brenzkatechin erhalten, so dass dasselbe in naher Beziehung zu den Gerbstoffen zu stehen scheint.

Aus einigen frischen Cacaobohnen hat Lazarus ein Ferment mittelst 20 % Alkohol ausgezogen, dessen diastatische Wirkung er durch Verzuckerung eines Stärkekleisters dargethan hat. Diese frischen Samen haben nach seiner Angabe weder Glykose noch Theo-

bromin enthalten, so dass er annahm, eine Spaltung des Glykosides trete bei der Gährnng der Samen ein.

Diese angeführten Versuche liessen es zweckmässig erscheinen, vor allem die genauen Umstände in den frischen Früchten an Hand von ausreichendem und zuverlässigem Material zu studieren und dann noch festzustellen, in welcher Weise das Glykosid zusammengesetzt ist beziehungsweise in welchen Gewichtsverhältnissen die Spaltung desselben vor sich geht.

Durch die gütige Vermittlung von Herrn Dr. Treub, Direktor des botanischen Gartens in Buitenzorg (Java), gelangte ich in den Besitz von ungefähr 20 Früchten von Theobroma Cacao, die bezüglich der Grösse und des Reifegrades von einander abwichen und bis zur Verwendung in Spiritus aufbewahrt waren. Die in einer holzigen, ca. 1 cm dicken Schale in grösserer Anzahl vorhandenen und auf dem Samenträger zu einer Säule zusammengedrängten Samen sind fast ohne Färbung, nehmen aber schon beim Liegen an der Luft, namentlich wenn zerquetscht, und bei jeder extraktiven Behandlung rasch eine Färbung an, die immer mehr in dunkelrot überging. Die Untersuchungen wurden sowohl auf die Samen, als auch die Samenschalen und das Fett ausgedehnt.

A) Samen.

Bei der Voruntersuchung der Samen wurde behufs Nachweis von freiem Theobromin bezw. Coffein mit Chloroform extrahiert, der Verdunstungsrückstand in Wasser aufgenommen, filtriert, eingedampft und mit dem Rückstand die Amalinsäurereaktion angestellt, welche die Anwesenheit von Theobromin bezw. Coffein in den frischen, sogar noch nicht ausgereiften Samen ergab, was ich gegenüber früheren Arbeiten besonders betonen möchte.

Da auch Zucker in reichlicher Menge vorhanden war, so war auch hier die Möglichkeit geboten, dass neben dem Glykoside wie in den Kolanüssen ein Ferment vorhanden sein müsse, welches allmählich eine Spaltung bewerkstelligt und es wurde zunächst zur möglichst ökonomischen Verwendung des Materials die Isolierung dieses Ferments versucht.

Darstellung des Ferments.

Die von den Schalen befreiten Samen wurden zerstampft und davon ein Teil mit durch Wasser etwas verdünntem Glycerin (3 : 1), der andere mit 20 % Spiritus einen Tag lang in der Kälte ausgezogen und durch Kolieren und nachheriges Filtrieren vom Rückstande befreit. Die Filtrate wurden mit einer hinreichenden Menge absoluten Alkohols versetzt, wodurch eine flockige Ausscheidung bewirkt wurde. Das Abgeschiedene wurde nach dem Dekantieren und Filtrieren in Wasser gelöst, nochmals mit absolutem Alkohol zur Ausscheidung gebracht und die gleiche Manipulation behufs möglichster Befreiung von Schleimstoffen nochmals wiederholt. Die jedesmalige Filtration geschah mittelst der Saugpumpe durch gereinigten Asbest in einer nach dem Allihn'schen Prinzip ausgezogenen entprechenden Röhre, in welcher dann auch unter Vermeidung von Trockenwerden die sofortige Auflösung in Wasser wieder vorgenommen werden konnte.

Um zu erfahren, ob der isolierte Körper fermentartige Eigenschaften besitze, wurde die wässrige Lösung desselben nach Untersuchung auf Beimengungen (Zucker), welche eine Reduktion von Fehling'scher Lösung bewirken könnten, und nachdem durch diesen Versuch eine Reduktionsfähigkeit der Fermentlösung an und für sich ausgeschlossen war, zu einer stark verdünnten Stärkelösung gegeben und im Wasserbade einer Tem-

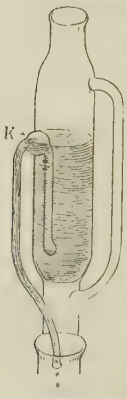
peratur, welche 55° nicht überschritt, ausgesetzt. Schon nach einer halben Stunde war ein Teil der Stärke in Zucker umgewandelt, so dass die Lösung mit 1—2 Tropfen frisch bereiteteter Fehling'scher Lösung eine deutliche Reduktion zeigte. Es sind in der beschriebenen Weise verschiedene Versuche angestellt worden, welche alle ergaben, dass die isolierte Substanz ein Ferment ist, welchem die Eigenschaft zukommt, Stärke in Zucker umzuwandeln und auch, wie bei einem späteren Versuche erläutert wird, das freigemachte Glykosid in seine Bestandteile zu zerlegen.

Sowohl die Extraktion mit Glycerin als mit 20proc. Spiritus führte bei der Isolierung des Fermentes zum Ziele, doch ist die Behandlung mit Glycerin wegen der fast undurchführbaren Filtration der dabei erhaltenen breiartigen Emulsion sehr beschwerlich und wegen der langen Zeitdauer die Wirksamkeit des Ferments oft in Frage gestellt, weshalb auch bei den Wiederholungsversuchen immer die Extraktiou mit 20proc. Spiritus gewählt wurde. Die spirituösen Filtrate wurden nach Ausfällung des Ferments durch Destillation von Spiritus befreit und dann zu einem Extrakte eingedampft, das gemeinschaftlich mit dem auf die nachher zu beschreibende Art erhaltenen Auszug zur Gewinnung des Glykosides verwendet worden ist.

Darstellung des Glykosides.

Die Samenrückstände nach der Beseitigung des Ferments wurden im Soxhlet'schen Apparat mittelst Petroläther von Fett befreit. Da die folgenden Versuche lehrten, dass das Fett sehr schwer in diesem Apparat vollständig zu entfernen ist, nacher bei Extraktion des Glykosids mit in Lösung geht und demselben bei seiner Isolierung anhaftet, so musste die Entfettung sehr lange fortgesetzt werden. Dabei hatte ich Ge-

legenheit an den Soxhlet'schen Apparaten folgende Beobachtung zu machen. Wenn dieselben kurze Zeit im Gange sind, tritt der Umstand ein, dass der mit Fett gesättigte Ablauf, wenn der leichter flüchtige Teil des Petroläthers überdestilliert ist, nur durch gesteigerte Temperatur im Destillieren erhalten werden kann. Hat sich nun der Extraktionscylinder bis zum Uebergewicht gefüllt, so entleert er sich auf einmal durch den Heber in den Destillationskolben und da nun das Wasserbad für den nunmehr stärkeren Aether eine zu hohe Temperatur hat, fängt die Flüssigkeit an aufzuschäumen und steigt, wenn nicht sofort gekühlt wird, in den obern Cylinder hinauf und die stürmische Destillation droht feuersgefährlich zu werden. Diesem Uebelstande könnte durch häufiges Wechseln des Aethers oder durch Wahl eines Destillationskolbens, der grösser als der für den Apparat gewöhnlich bestimmte, teilweise vorgebeugt werden, doch ist auch letzteres wegen Verdichtung eines Teils des Aethers im Kolben selbst nicht vollkommen. Ich empfehle daher eine kleine Abänderung am Cylinder des Soxhlet'schen Apparates:



Durch Anblasen einer kleinen Kugel an der obern Biegestelle (K der nebenstehenden Figur) des als Heber funktionierenden syphonartigen Ablaufrohres wird bewirkt, dass die Entleerung des Cylinderinhaltes nicht heberartig auf einmal erfolgen kann, sondern dass von der spezifisch schwereren, mit Fett gesättigten Extraktionsflüssigkeit stetig nur soviel abfliesst, als oben vom Kühler hineinläuft, und der Apparat kann so tagelang ohne besondere Bewachung im Gange gehalten werden.

Nach möglichster Entfettung, wobei auch das freie Coffein in Lösung gegangen war, wurden die Samenrückstände mittelst 90proc. Alkohols

am Rückflusskühler wiederholt ausgezogen, bis der Spiritus keine Färbung mehr erlitt. Die vereinigten spirituösen Auszüge wurden durch Destillation von Spiritus befreit und zur Trockne verdampft. Das Extrakt, mit welchem auch der Verdampfungsrückstand aus den oben erhaltenen Spirituslösungen, aus denen das Ferment ausgefallen war, vereint worden war, wurde mit kochendem Wasser von Zucker, Salzen, freiem Theobromin, organischen Säuren möglichst befreit — aus dieser wässrigen Lösung wurde, wie unten mitgeteilt, der Zucker näher untersucht — und mittelst kalten Wassers, dem etwas Kalilauge zugesetzt war, zur Lösung gebracht, filtriert und mit Salzsäure schwach übersättigt, wodurch eine flockige voluminöse hellbraune Abscheidung eintrat. Die Abscheidung wurde nach dem Abheben der überstehenden Flüssigkeit durch Auflösen in kalihaltigem Wasser und Abscheidung mit Salzsäure gereinigt und dies Verfahren so oft wiederholt, bis das Filtrat keine Zuckerreaktion mehr gab und der Niederschlag möglichst aschefrei war. Die Filtrationen wurden mittelst der Saugpumpe beschleunigt, da schon an der Luft spurenweise Zersetzung und damit Zuckerabspaltung eintritt. Der nunmehr rotbraune Niederschlag wurde möglichst rasch auf Tontellern unter der Luftpumpe getrocknet und dann im Soxhlet'schen Apparat mit Chloroform behandelt, um von etwa noch vorhandenem Theobromin und Coffein, sowie von den letzten Spuren Fett zu befreien. Zur Feststellung, ob der isolierte Körper thatsächlich aus einem theobromin- resp. coffeinhaltigen Glykoside bestände, wurde folgender Versuch angestellt.

Ein Probe wurde, nachdem mit Wasser behandelt und das Filtrat mit Fehling'scher Lösung auf Abwesenheit von Zucker geprüft war, mit wenig 5proc. Schwefelsäure $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lang erhitzt. Nach diesem

Zeitraum wurde mit Alkali übersättigt, filtriert und mit Fehling'scher Lösung auf Zucker geprüft, durch deren Reduktion die Anwesenheit eines reduzierenden Zuckers angezeigt wurde.

Eine andere Probe wurde ebenfalls mit 5proc. Schwefelsäure am Rückflusskühler längere Zeit im Sieden erhalten. Auch nach längerer Zeit blieb ein dunkelrother unlöslicher Rückstand, von dem abfiltriert wurde. Die Schwefelsäure wurde durch frisch gefälltes Baryumkarbonat abgestumpft. Von abgeschiedenem Baryumsulfat und überschüssigem Baryumcarbonat befreit, wurde das Filtrat mit viel Chloroform geschüttelt und im Scheidetrichter getrennt. Die Chloroformlösung, abdestilliert, hinterliess nadelförmige Krystalle, mit welchen die Amalinsäurereaktion angestellt wurde, indem ihre wässrige Lösung mit frisch bereitetem Chlorwasser abgedampft und mit Ammoniak betupft wurde. Hierdurch wurde die Anwesenheit von Theobromin und Coffein festgestellt und damit die Abspaltung dieser Stoffe aus dem isolierten Körper bewiesen.

Es wurden auch Versuche angestellt, bei welchen nach Abstumpfung der Schwefelsäure durch Baryumkarbonat zur Trockne verdampft und das Theobromin resp. Coffein mittelst Chloroform ausgezogen wurde. Diese Methode führte ebenfalls zum Ziele und wurde auch später zu den quantitativen Bestimmungen gewählt. Dagegen ist bei Abstumpfung mit Baryumhydroxyd darauf zu achten, dass der Ueberschuss durch Kohlensäure vollständig ausgefällt wird, da sonst schon beim Kochen der Lösung mit überschüssigem Baryumhydroxyd z. B. das Coffein sich zersetzt unter Entwicklung von Methylamin und Ammoniak, Abscheidung von Baryumkarbonat und Bildung von Coffeidin.

Um die Einwirkung des Ferments auf das isolierte Glykosid zu beobachten, wurde Ferment frisch darge-

stellt und eine wässrige Lösung davon mit dem Glykosid bei einer Temperatur von ca. 50° 2—3 Stunden lang in Berührung gelassen, hierauf nach dem Neutralisieren und Filtrieren in der einen Hälfte mittelst frisch bereiteter Fehling'scher Lösung Zucker nachgewiesen, die andere Hälfte mit Sand eingedampft, mit Chloroform extrahiert und mit dem Verdampfungsrückstand die Amalinsäurereaktion angestellt.

Hiedurch wurde festgestellt, dass auf die beschriebene Art einerseits ein Theobromin resp. Coffein abspaltendes Glykosid isoliert wurde, anderseits aus den Cacaosamen ebenfalls ein Ferment dargestellt werden kann, welches die Zersetzung des Glykosides bewerkstelligt, und dass das Vorkommen von freiem Theobromin resp. Coffein neben gebundenem der Einwirkung dieses Ferments in den lebenden Pflanzen zuzuschreiben ist.

Zur Charakterisierung der Zuckerart wurde eine Probe des Glykosides auf die oben angegebene Weise gespalten, die Schwefelsäure mit Baryumkarbonat abgestumpft, eingedampft und mit rektifiziertem Methylalkohol der Zucker ausgezogen. Die Lösung wurde eingedampft zur Krystallisation beiseite gesetzt. Da jedoch die erhaltene Ausscheidung zu gering war zur Reinigung, wurde die ganze Probe wieder eingedampft, in 10,0 Wasser gelöst, 1,0 salzsaures Phenylhydrazin, 1,5 Natriumacetat gelöst und $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbade erhitzt; hierdurch wurde eine genügende Menge eines gelben Osazons erhalten, so dass der Schmelzpunkt bei 204—5° liegend festgestellt werden konnte, welcher dem Glykoseosazon eigen ist. Durch den Schmelzpunkt zeigte der aus dem Glykoside abgeschiedene Zucker auch Uebereinstimmung mit dem in den Cacaosamen frei vorkommenden Zucker, welcher auf folgende Art isoliert wurde.

Die wässrige Lösung, welche aus dem Verdampfungsrückstande der spirituösen Auszüge gewonnen wurde,

bevor das Glykosid in alkalihaltigem Wasser zur Lösung gebracht wurde, und welche ausser Zucker noch Salze, organische Säuren u. s. w. enthielt, wurde mit einer Lösung von neutralem essigsauren Blei unter möglichster Vermeidung eines Ueberschusses versetzt, um die organischen Säuren auszufällen. Nachdem von dem Bleiniederschlag, in welchem, wie unten angegeben, die Säuren näher untersucht wurden, abfiltriert und der Ueberschuss von Bleiacetat durch Natriumsulfat entfernt war, wurde eingedampft und der Zucker mit 90proc. Alkohol aufgenommen. Diese Lösung wurde in der Wärme zweimal mit soviel Strontiumhydroxyd ausgefällt, bis die überstehende Flüssigkeit keine Zuckerreaktion mehr zeigte, nach dem Abfiltrieren das Strontiumsaccharat mit Wasser angerührt und in der Siedehitze durch längeres Einleiten von Kohlensäure zersetzt, das Filtrat eingedampft, der Zucker mit rektifiziertem Methylalkohol gelöst und zur Krystallisation beiseite gesetzt. Die gereinigten Krystalle gaben ein Osazon, das nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol einen Schmelzpunkt von 204° zeigte und sich damit als Glykoseosazon und der Zucker also als Glykose erwies.

Der erhaltene Bleiniederschlag, welcher die vorhandenen Säuren enthielt, wurde mit Wasser aufgeschlemmt und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt. Die frei gewordenen Säuren wurden abfiltriert, mit Tierkohle entfärbt, eingedampft und in der konzentrierten Lösung auf die Säuren geprüft.

Da in einer Probe dieser Lösung Chlorcalcium einen Niederschlag verursachte, der in Essigsäure löslich war, wurde die ganze Menge mit Chlorcalciumlösung und Kalkwasser bis zur alkalischen Reaktion versetzt; von dem erhaltenen Niederschlag wurde abfiltriert.

Das Filtrat zum Sieden erhitzt gab keinerlei Ausscheidung, weshalb dasselbe eingeengt und mit Wein-

geist versetzt wurde. Hierauf entstand eine Fällung von äpfelsaurem Calcium, das sich mit konzentrierter Schwefelsäure unter Schwarzfärbung zersetzte.

Der Niederschlag wurde mit kalter Kalilauge behandelt, wodurch er vollständig in Lösung ging. Beim Kochen trat jedoch eine gallertartige Ausscheidung ein und die anwesende Säure kennzeichnete sich somit als Weinsäure. Nachgewiesen wurden also Aepfelsäure und Weinsäure.

B) Samenschalen.

Die getrockneten und zerkleinerten Samenschalen wurden im Drechsler'schen Apparat mittelst Petroläther von Fett befreit und hierauf mit Alkohol möglichst erschöpfend extrahiert. Der spirituöse Auszug wurde eingedampft und zunächst mit Wasser ausgekocht, um Salze, Zucker, der reichlich vorhanden war, u. s. w. zu entfernen. Hierauf wurde in alkalihaltigem Wasser aufgenommen, filtriert und mit Salzsäure schwach übersättigt. Hierdurch entstand eine flockige Abscheidung, welche sich nach dem Absitzen, Auswaschen und Trocknen beim Behandeln mit 5 % Schwefelsäure durch Abspaltung von Theobromin, Zucker und dem roten Farbstoff ebenfalls als Glykosid erwies. Es war verhältnismässig nicht so reichlich vorhanden, wie in den Samen, doch ist es interessant, nachgewiesen zu haben, dass dies auch in den Schalen vorhanden ist.

Eine Isolierung der Schleimstoffe, welche in Samen und Schalen reichlich vorhanden sind, wurde ebenfalls versucht, indem Proben mit Wasser ausgekocht und aus den kolierten Flüssigkeiten durch Zusatz von Alkohol die Schleimstoffe ausgefällt wurden. Die Fällung wurde sofort wieder in Wasser gelöst, angesäuert und mit Alkohol nochmals ausgefällt und auf Tontellern getrocknet. Beim Glühen dieser Substanz durch Natronkalk entwickelte sich kein Ammoniak da Kurkumapapier

in keiner Weise verändert wurde, es waren somit diese Schleimstoffe frei von Stickstoff. Die wässrige Lösung dieser Schleimstoffe wurde durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure hydrolisiert und zeigte dann deutliche Reduktion der Fehling'schen Lösung, wodurch bewiesen war, dass sie zu denjenigen gehören, bei welchen Spaltung in Zucker möglich ist.

C) Das Fett der frischen Früchte.

Das Cacaofett enthält nach den Untersuchungen von Graf[1]) die Glykoside von Arachinsäure, Oelsäure, Stearin-, Palmitin- und Laurinsäure, sowie Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure. Freie Fettsäure enthält das Cacaofett nur in sehr geringer Menge und ausserdem noch ein Cholesterin, welches nicht näher charakterisiert ist. Es erschien wertvoll, festzustellen, ob das Fett der frischen Früchte eventuell Abweichungen in der Zusammensetzung zeige.

Die Rückstände der mittelst Petroläther aus den Samen und den Schalen gewonnenen Auszüge wurden vereint, durch Erwärmen auf dem Wasserbade von Petroläther vollständig befreit und beim Erkalten umgerührt, um eine gleichmässige Erstarrung und Zusammensetzung des Fettes zu erzielen. Es wurde zunächst der Schmelzpunkt bestimmt und zwar in geschlossenem Röhrchen nach Graf; er lag zwischen 33—34°.

Zur Bestimmung der freien Säuren wurde 1 g Fett in Aetheralkohol gelöst und nach der Merz'schen Methode mittelst $^1/_{10}$ Kalilauge titriert, wodurch sich ein Verbrauch von 0,65 ccm ergab. Dem gegenüber steht der Verbrauch von 0,45 ccm zur Neutralisation der freien Säuren im Fette des Handels, so dass also von den freien Säuren etwas mehr vorhanden wäre, aber immer noch eine Menge, welche im Vergleich zu den gebundenen Säuren verschwindend ist.

1) Archiv der Pharmacie 26. Bd., 18. Heft, 1888.

Hierauf wurde eine Verseifung des Fettes mit 5proc. alkoholischer Kalilauge am Rückflusskühler vorgenommen, nach Einleiten von Kohlensäure zur Abstumpfung des überschüssigen Kalis der Weingeist verdampft und die gebildete Seife in Wasser gelöst. Aus dieser Lösung wurden die Fettsäuren ausgefällt und abfiltriert. Im sauren Filtrate wurde auf Glycerin untersucht, indem mit Soda neutralisiert, eingedampft, nach Zusatz von schwefelsaurem Kali und wenig Wasser nochmals verdampft und dann im Kaliglas geglüht wurde; die entweichenden Akroleindämpfe wurden durch Einleiten in eine mit schwefliger Säure eben entfärbte Fuchsinlösung charakterisiert.

Zunächst wurden die erhaltenen und ausgewaschenen Fettsäuren auf flüchtige Säuren untersucht, indem mit Wasserdämpfen überdestillirt wurde. Das wässrige Destillat enthielt ein aromatisches Oel, das sich mit Aether teilweise ausschütteln liess, aber zu wenig war, um weitere Untersuchungen zu gestatten. Die wässrige Lösung wurde mit Soda genau neutralisiert und eingedampft. Eine Probe des geringen Rückstandes gab in Alkohol gelöst und mit Schwefelsäure erhitzt den charakteristischen Geruch des Buttersäureätylesters.

Eine Lösung in Wasser gab mit ammoniakalischer Silbernitratlösung sowohl, wie mit neutraler Sublimatlösung eine Reduktion, welche die Anwesenheit von Ameisensäure bewies.

Das trockene Salz im Rohre mit arseniger Säure erhitzt, gab deutliche Kakodylreaktion.

Von flüchtigen Fettsäuren wurde demnach Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure nachgewiesen.

Von den mit Wasserdämpfen nicht flüchtigen Säuren wurde ein Teil in Alkohol gelöst und mittelst alkoholischer Bleiacetatlösung gefällt, abfiltriert, getrocknet und mit Aetheralkohol behandelt. Das Filtrat wurde

vorsichtig mit Schwefelsäure versetzt, wodurch Abscheidung von schwefelsaurem Blei enstand. Die ätherische Lösung, welche die Oelsäure enthalten musste, wurde abgedunstet, die Säure in 60proc. Alkohol aufgenommen und mit kaltgesättigter Lösung von Baryumacetat in gleichstarkem Alkohol versetzt. Nach dem Absitzen, Filtrieren und Trocknen wurde eine abgewogene Menge der Substanz in Baryumsulfat verwandelt und aus der erhaltenen Menge der Gehalt an BaO berechnet. Die gefundene Menge entsprach 21,52 % BaO, während sich für ölsaures Baryum der Gehalt an BaO auf 21,5 % berechnet. Es war somit Oelsäure nachgewiesen.

Zur Identifizierung der übrigen Fettsäuren wurde der Rest der nicht mit Wasserdämpfen flüchtigen Säuren nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol in 50—60 % Alkohol gelöst und mittelst kaltgesättigter Baryumacetatlösung in gleichstarkem Alkohol fraktionierte Fällungen vorgenommen. Die erhaltenen Fällungen wurden nach dem Trocknen und Wiegen durch Glühen mit Schwefelsäure in Baryumsulfat verwandelt und daraus die Menge BaO berechnet.

Die zu untersuchende Menge war gering, weshalb nur wenige Fällungen vorgenommen werden konnten, deren Resultate folgende waren:

Gefundene Menge BaO	Angewandte Subst.	% an BaO	% BaO berechnet für
0,0058	0,028	20,7	20,1 % BaO für Arachinsäure
0,0077	0,036	21,4	21,4 % für Stearinsäure
0,0099	0,045	22,0	21,5 % für Oelsäure
0,0127	0,05	23,4	23,62 % für Palmitinsäure
0,0092	0,037	24,8	
0,007	0,025	28,0	28,6 % für Laurinsäure

Es bestätigt sich hiemit die Anwesenheit von Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Ölsäure und vielleicht Arachinsäure; eine höhere Säure wurde nicht gefunden.

Der auch nach einer mit stärkerer alkoholischen Kalilauge vorgenommenen Verseifung verbliebene Rückstand löste sich in Chloroform sehr leicht auf und gab in dieser Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure sehr deutliche Cholesterinreaktion. Ein Auskrystallisieren aus Chloroform war nicht möglich, weshalb nach dem vollständigen Verdampfen des Chloroforms mit heissem Aceton aufgenommen wurde. Beim Abkühlen dieser Lösung schieden sich gelbe Blättchen ab, welche nach dem Trocknen den Schmelzpunkt bei 145 – 146° zeigten.

Besonders auffallend ist, dass sich diese Cholesterinkörper sehr schwer mit dem Fett aus der Drogue vollständig entfernen lassen und dann bei Extraktion mit Weingeist in dem Rückstande des Alkoholes nach Ausziehen des Glykosides durch alkalihaltiges Wasser sich verhältnissmäsig reichlich finden.

Das Fett zeigte nach diesen Untersuchungen, abgesehen von dem unbedeutenden Überwiegen der ohnedem nur in geringer Menge vorhandenen freien Fettsäure, die gleiche Zusammensetzung wie das Cacaofett des Handels.

D) Spaltung des Cacaoglykosides.

Zur näheren Erforschung des Cacaoglykosids bezüglich seiner Molekularkonstitution wurde dasselbe in grösserer Menge dargestellt. Zu diesem Zwecke hat mir die Firma Gebrüder Stollwerk in Köln in gefälliger Weise 10 Kilo einer möglichst frischen ungerotteten Handelsware abgelassen.

Die Entfettung mit Petroläther und die erschöpfende spirituöse Extraktion hat mir die chemische Fabrik von Schimmel & Cie. liebenswürdigst besorgt, der ich auch

an dieser Stelle für das bewiesene Entgegenkommen bestens danke.

In der weitern Darstellung verfuhr ich wie bei den oben angegebenen experimentellen Versuchen. Das dargestellte Glykosid hatte nach dem Trocknen eine rotbraune Farbe, war von amorfer Beschaffenheit und betrug ca. 60 g aus der oben angegebenen Menge.

Bei den nun vorgenommenen Spaltungen mit verschieden starker Schwefelsäure konnte eingesehen werden, dass bei der Behandlung mit 5proc. Schwefelsäure die Spaltung des Glykosids keineswegs eine vollständige ist, sondern dass mit der stufenweisen Verstärkung der Schwefelsäure auch die Zersetzung eine fortschreitende ist, die jedoch bei dem Gebrauch der stärkeren Säure nur noch an dem Anwachsen des Zuckergehaltes nachzuweisen war, da das Theobromin beim Kochen mit stärkerer Säure eine teilweise und mit 15—20proc. Säure vollständige Umwandlung erfahren hat.

Es wurden besondere Versuche angestellt, indem reines Theobromin und Coffein mit 20proc. Schwefelsäure einige Zeit gekocht wurde, wonach nach Neutralisieren mit Baryumkarbonat und Eindampfen durch Chloroform kein Theobromin und Coffein ausgezogen werden konnte, das die Amalinsäurereaktion ergeben hätte.

Dagegen konnte bei der Spaltung durch die 20proc. Schwefelsäure ein Maximumgehalt an Glykose von 2,75—2,8 % festgestellt werden, ohne dass natürlich mit Bestimmtheit angenommen werden kann, ob die Zersetzung nun eine vollständige war, beziehungsweise ob die Glykose nicht auch teilweise durch das Kochen mit der 20proc. Schwefelsäure verändert worden ist.

So musste ich mich darauf beschränken, zu erforschen, in welchem Verhältnisse zu einander sich Glykose und Teobromin bezw. Coffein bei der Spaltung überhaupt abscheiden.

Zu diesem Zwecke wurden abgewogene Mengen mit 6 % Schwefelsäure während 4—6 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Hierauf wurde vom Cacaorot abfiltriert, mittelst frischgefällten Bayriumkarbonats die Schwefelsäure genau neutralisiert und mit Sand eingedampft. Der Rückstand wurde im Soxhlet mit vollständig wasserfreiem Chloroform einige Zeit extrahiert, um das Theobromin und Coffein zu gewinnen, hierauf ebenfalls im Soxhlet der Zucker durch Spiritus extrahiert. Der Rückstand des Chloroformauszuges wurde in Wasser aufgenommen, um das etwaige Fett möglichst zurückzulassen, filtriert, in gewogener Platinschale eingedampft und das Gewicht bestimmt. Die spirituöse Zuckerlösung wurde abgedampft, in Wasser aufgenommen und der Zuckergehalt mittelst Fehling'scher Lösung gewichtsanalytisch bestimmt.

Von verschiedenen versuchten Methoden zur Bestimmung von Theobromin einerseits und Glykose andererseits in ein und derselben Probe ist die angegebene als die zweckmässigste gefunden worden, vorausgesetzt, dass man frischgefälltes, von Soda durch Auswaschen vollständig befreites Baryumkarbonat verwendet und einen Ueberschuss desselben beim Neutralisieren möglichst vermeidet.

Das Ergebnis der Analysen war folgendes:

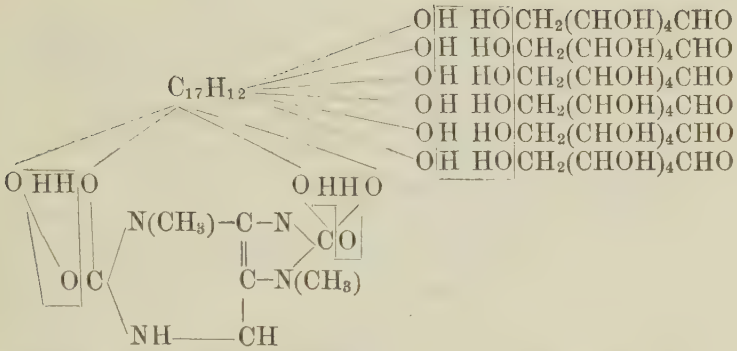
I.	Theobromin	und	Coffein	0,172 %	Glykose 0,978 %
II.	„	„	„	0,18 %	„ 1,09 %.

Die Trennung von Theobromin und Coffein wurde nach der bereits im ersten Teil der Arbeit geschilderten Methode durch Bildung von Theobrominsilber vorgenommen und es ergab sich im Mittel eine Beimengung von 0,3 % Coffein.

Ignoriert man bei der Berechnung der Verhältniszahl die geringe Menge Coffein, bezw. rechnet dafür ebenfalls Theobromin, so drücken, da das Melekulargewicht von Theobromin sowohl wie von Glykose = 180 ist, die Procentzahlen direkt das Verhältnis der beiden zu einander aus und es ist

I. Theobromin: Glykose = 0,172:0978 = 1:6,03
II. „ : „ = 0,18:1,09 = 1:6,05.

Es ist also in einem Glykosidmolekül ausser dem Cacaorot noch ein Teil Theobromin und sechs Teile Zucker enthalten. In welchem Verhältnis das Cacaorot zu den beiden andern Körpern im Glykosidmolekül enthalten ist, konnte auf diese Weise nicht ermittelt werden, da einerseits das Glykosid wegen seiner leichten teilweisen Zersetzlichkeit schon in der Pflanze nur mit dem bereits abgeschiedenen Cacaorot — wegen Löslichkeit desselben in alkalihaltigem Wasser und Abscheiden beim Uebersättigen mit Säure — gemischt gewonnen werden kann, andererseits die Schwierigkeit einer vollständigen Zersetzung, oder bei Anwendung starker Säuren die eintretende Veränderung des Farbstoffs, der Reindarstellung des Cacaorots im Wege ist. Es ergeben somit Verbrennungen des Glykosids und des als Cacaorot bei der Zersetzung mit Schwefelsäure zurückgebliebenen Rückstands keine Anhaltspunkte, aber da die von Lazarus für das Cacaorot aufgestellte Formel $C_{17}H_{12}(OH)_{10}$ zehn Hyproxylgruppen enthält, so ist höchst wahrscheinlich dieselbe nur einmal im Glykosidmolekül enthalten und es liesse sich folgende Gruppierung denken:



welches eine esterartige Verbindung von einem Molekül Cacaorot, sechs Molekülen Glykose und einem zweiseitig gebundenen Molekül Theobromin vorstellt, dem die Gesamtformel $C_{60}H_{86}O_{15}N_4$ zukommen und das bei der Hydrolyse acht Moleküle H_2O zur Spaltung in seine Bestandteile aufnehmen würde. Ausserdem könnten die Glykosemoleküle noch infolge Anhydridbildung ätherartig unter einander verbunden gedacht werden.

Vergleicht man diese Gesamtformel mit den von Lazarus bei der Verbrennung des Cacaoglykosids gefundenen Werten $C_{34}H_{48}O_{18}N_2$ oder verdoppelt $C_{68}H_{96}O_{36}N_4$ so sieht man, dass letztere im Stickstoffgehalt übereinstimmend mit den Zahlen für C und H in dem gleichen Verhältnis überschiessen, in welchem dieselben in dem stickstofffreien Cacaorot enthalten sind, was eben gerade der auch sonst bestätigten Thatsache entspricht, dass von dem bereits vor der Extraktion zersetzten Glykoside Zucker und Theobromin besonders ausgezogen werden können, aber das dabei als drittes Abscheidungsprodukt entstandene Cacaorot dem noch unzersetzten Glykoside bei seiner Gewinnung beigemischt bleibt. Lazarus selbst sagt über das zur Verbrennung verwendete Glykosid, dass ein Auswaschen desselben mit Wasser so lange bis im Ablauf kein Zucker nachgewiesen werden

konnte, notwendig gewesen wäre, da bei der Berührung mit alkalihaltigem Wasser und Luft eine geringe Spaltung des Glykosids eingetreten war. Nur die von Lazarus angegebene Menge O ist eine grössere, was seine Erklärung darin findet, dass dieselbe jedenfalls aus der Differenz bestimmt worden ist, das Glykosid jedoch trotz meinen eingehendsten Bestrebungen nicht aschefrei gewonnen werden konnte, wodurch sich bei der Berechnung aus den Verbrennungsprodukten der Sauerstoffgehalt höher gestellt hat. Immerhin sind die bei der Verbrennung gefundenen Werte in gewissem Sinne eine Bestätigung der aus den Spaltungsprodukten aufgestellten Molekularzusammensetzung.

Fasse ich die Resultate der vorstehenden Arbeit zusammen, so kann ich über die fraglichen Verhältnisse in den Kolanüssen und Cacaosamen Folgendes feststellen:

I. Kolanüsse.

Die frischen Kolanüsse sowohl wie die getrockneten enthalten freies Coffein und Theobromin, sowie auch Zucker.

In den frischen Früchten ist ein Ferment vorhanden, welches imstande ist, Stärke zu invertieren und das Glykosid in seine Spaltungskörper zu zerlegen. Seiner Einwirkung auf das Glykosid ist das Vorhandensein von freiem Coffein und Theobromin in den lebenden Früchten zuzuschreiben.

Die Kolanüsse enthalten ein Glykosid, welches durch Fermente oder verdünnte Säuren in Coffein und Theobromin, Zucker und den eigentlichen stickstofffreien Farbstoff, das Kolarot, zerfällt.

Dem Kolaglykosid dürfte die Formel $C_{40}H_{56}N_4O_{21}$ zukommen, und es liesse sich dafür die oben (pag. 18) erwähnte esterartige Gruppierung denken, bei welcher

sich durch Aufnahme von vier Molekülen Wasser die nachgewiesene Spaltung in ein Molekül (Coffein, Theobromin) drei Moleküle Glykose und ein Molekül Kolarot $C_{14}H_{13}(OH)_5$ vollziehen würde.

Das in freiem Zustande vorhandene Coffein enthält 1,2 % Theobromin, während das infolge Spaltung mit verdünnter Schwefelsäure erhaltene einen Gehalt von 19,7 % Theobromin zeigte.

II. Cacaosamen.

Das Fett in den frischen Früchten hat dieselbe Zusammensetzung wie das aus den trocknen Samen gewonnene. Für das darin enthaltene Cholesterin konnte ich nach Umkrystallisieren aus heissem Aceton den Schmelzpunkt bei 145—146° liegend feststellen.

Die Cacaosamen enthalten schon im nicht vollständig ausgereiften Zustand freies Teobromin und Coffein, reichlich Zucker, ferner ein Ferment, dessen diastatische Einwirkung auf das Glykosid hinlänglich bewiesen wurde und auf dessen Vorhandensein die Anwesenheit der freien Xanthinderivate in den frischen Früchten zurückzuführen ist.

Das stickstoffhaltige Glykosid zerfällt durch Einwirkung von diastatischen Fermenten oder verdünnten Säuren in Theobromin und Coffein, Zucker und den stickstoffreien Farbstoff, das Cacaorot. Diese Zersetzung findet teilweise in den lebenden Früchten in fortschreitender Weise statt.

Dem Cacaoglykoside dürfte die Formel $C_{60}H_{86}O_{15}N_4$ zukommen und es liesse sich dafür die pag. 37 angegebene esterartige Gruppierung denken, bei welcher durch Aufnahme von 8 Molekülen Wasser die erwiesene Spaltung in 1 Molekül (Theobromin, Coffein), 6 Moleküle Glykose und 1 Molekül Cacaorot $C_{17}H_{12}(OH)_{10}$ eintritt.

Die Xanthinderivate bestehen aus 99,7 % Theobromin und ungefähr 0,3 % Coffein, es ist also letzteres im Verhältniss nur in geringer Menge vorhanden.

Auch die Cacaoschalen enthalten das Glykosid, aber in zurücktretendem Masse.

Anschliessend nehme ich Veranlassung, Herrn Hofrat Professor Dr. Hilger für die gütige Zuweisung vorstehender Arbeit sowie für die mir bei der Ausführung derselben liebenswürdigst gewährten Unterweisungen meinen warmen Dank auszusprechen.